

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 6 月 12 日 (12.06.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/047607 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 35/50, 103-8426 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号 Tokyo (JP).
A61P 3/10, 19/00, 19/08, 9/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/12761 (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 二階堂 敏雄 (NIKAIDO, Toshio) [JP/JP]; 〒390-0312 長野県松本市岡田松岡403-15 Nagano (JP).
- (22) 国際出願日: 2002 年 12 月 5 日 (05.12.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (74) 代理人: 大野 彰夫, 外(OHNO, Akio et al.); 〒140-8710 東京都品川区広町1丁目2番58号三共株式会社内 Tokyo (JP).
- (30) 優先権データ:
特願2001-372878 2001 年 12 月 6 日 (06.12.2001) JP
特願2002-262265 2002 年 9 月 9 日 (09.09.2002) JP
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三共株式会社 (SANKYO COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒

[続葉有]

(54) Title: MEDICINAL COMPOSITIONS CONTAINING HUMAN AMNION-ORIGIN CELLS

(54) 発明の名称: ヒト羊膜由来細胞含有医薬組成物

(57) Abstract: It is intended to provide medicinal compositions containing, as the active ingredient, epithelial cells or mesenchymal cells originating in human amnion which are usable as a substitute for human fetal stem cells because of having regeneration ability and can be relatively easily obtained by using usual surgical techniques from maternal humans giving informed consent. More specifically, medicinal compositions such as remedies for diabetes which contain the above epithelial cells as the active ingredient, or medicinal compositions such as remedies for bone metabolic errors or heart diseases which contain human amnion-origin mesenchymal cells as the active ingredient. Thus, it becomes possible to provide medicinal compositions such as remedies for diabetes by using regeneration therapy without causing any ethical problems.

(57) 要約:

この出願は、医薬分野に属する。

具体的には、ヒト胎児由来の幹細胞に代替し得る再生能力を有し、インフォームドコンセントを得たヒト妊婦から通常の外科的手法で比較的容易に入手し得るヒト羊膜に由来する上皮細胞もしくは間葉系細胞を有効成分とする医薬組成物を提供するものであり、より具体的には、同上皮細胞を有効成分とする糖尿病治療剤等の医薬組成物、もしくはヒト羊膜由来間葉系細胞を有効成分とする骨代謝異常疾患治療剤・心臓疾患治療剤等の医薬組成物を提供するものである。

本発明により、倫理的問題の生じないように、再生医療技術を用いた糖尿病治療薬等の医薬組成物を提供することが可能となる。



WO 03/047607 A1

BEST AVAILABLE COPY



NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て:

- AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,

MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)の指定のための出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て (規則4.17(ii))

添付公開書類:

- 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

ヒト羊膜由来細胞含有医薬組成物

〔技術分野〕

本発明は、ヒト羊膜由来上皮細胞を有効成分とする糖尿病治療剤及びヒト羊膜由来上皮細胞を糖尿病患者に投与することを特徴とする糖尿病治療法に関し、また、ヒト羊膜由来間葉系細胞を有効成分とする骨代謝異常症治療剤及びヒト羊膜由来間葉系細胞を骨代謝異常症患者に投与することを特徴とする骨代謝異常症治療法に関し、さらに、ヒト羊膜由来間葉系細胞を有効成分とする心臓疾患治療剤及びヒト羊膜由来間葉系細胞を心臓疾患患者に投与することを特徴とする心臓疾患治療法に関する。

〔背景技術〕

近年、再生医療なる技術が脚光を浴びるようになった。すなわち、ヒト又は他の生物の体は、一生の間に外傷や疾病によって組織の一部を失ったり、大きな障害を受けたりするが、この場合の再生能力は、動物種によっても、また、組織によっても異なっている。自然には再生できない臓器や組織を再生させ、機能を回復させるべく、未分化の細胞より生物機能を有する細胞を分化せしめる技術が発達した。このような技術は、一般に再生医療と呼ばれている。

しかしながら、従来、このような技術に供される細胞として、一般にヒト胎児由来の幹細胞が使用されており、倫理的な側面より問題視されていた。

〔発明の開示〕

本発明者は、かかる問題を克服すべく、ヒト胎児由来の幹細胞に代替し得る細胞を模索していたところ、ヒト羊膜由来の上皮細胞又は間葉系細胞を一定条件下で生物体内に投与すれば、生物体の病態を改善せしめることを見出し、本発明を完成した。

本発明は第一に、ヒト羊膜由来上皮細胞を有効成分とする医薬組成物に関する。

第二に、ヒト羊膜由来上皮細胞を有効成分とする糖尿病治療剤に関する。

第三に、ヒト羊膜由来上皮細胞を糖尿病患者に投与することを特徴とする糖尿病治療法に関する。

第四に、ヒト羊膜由来間葉系細胞を有効成分とする医薬組成物に関する。

第五に、ヒト羊膜由来間葉系細胞を有効成分とする骨代謝異常症治療剤に関する。

第六に、ヒト羊膜由来間葉系細胞を骨代謝異常症患者に投与することを特徴とする骨代謝異常症治療法に関する。

第七に、ヒト羊膜由来間葉系細胞を有効成分とする心疾患治療剤に関する。

第八に、ヒト羊膜由来間葉系細胞を心疾患患者に投与することを特徴とする心疾患治療法に関する。

本発明において、ヒト羊膜細胞は、インフォームドコンセントを得たヒト妊婦を帝王切開し、通常の外科的手法で得ることができる。

羊膜より上皮細胞は以下の方法で得ることができる。

得られた羊膜を、滅菌したハサミ等を用い断片化し、ダルベッコ修正イーグル培地等の通常の動物細胞の培養に用いられる培養液に入れ、振盪する。この場合、羊膜断片を個々の細胞に分散化するため、トリプシン等の蛋白質分解酵

素を共存させることが望ましい。好適な蛋白質分解酵素の濃度は、0.1%から0.5%である。また、振盪する場合の温度は、25℃から40℃の間が望ましい。振盪の間隔は、50rpm～200rpmが望ましく、振盪時間は、20分から60分が望ましい。

遠心操作で細胞を集めた後、上清を除去後、該細胞を前記と同様の条件下で、蛋白質分解酵素が共存する培養液中で再度振盪する。但し、振盪の間隔は、400rpm～600rpmが望ましく、振盪時間は、20分から60分が望ましい。

この後、培養溶液を滅菌ガーゼなどのメッシュで越し、上皮細胞を分離する。上皮細胞は遠心によって集め、10%の血清を含む培養液中で、CO₂ インキュベータ中で培養する。培養温度は37℃、CO₂ 濃度は5%が好ましい。血清は子牛血清又は子牛胎児血清が好ましい。また、培養液には、濃度1%前後の抗生物質（例えば、ペニシリン G、100 単位/ml：ストレプトマイシン、100 μg/ml：アンフォテリシン B、0.25 μg/ml）を共存させることが好ましい。ガーゼに残された羊膜は、上記と同様の方法で、再度断片化、さらに、細胞分散化することができる。

得られた上皮細胞は、遠心で集め、上記と同様に、10%の血清を含む培養液中で、CO₂ インキュベータ中で培養する。培養の細胞濃度は、 1×10^5 ～ 1×10^6 /ml が好ましい。

通常羊膜一枚から 5×10^7 個の上皮細胞が分離できる。

羊膜間葉系の細胞は、上皮細胞が完全に取り除かれた羊膜より、分離することができる。ガーゼなどのメッシュ上に残された羊膜を 0.1～1.0mg/ml のコラゲナーゼ（和光純薬（株）製）等の蛋白質分解酵素及 0.01～0.1mg/ml の DNA アーゼ（シグマ社）等の核酸分解酵素により振盪し、消化することができる。振盪の温度は、20～40℃が好ましく、振盪時間は30分間～120分間が好ま

しく、振盪の間隔は、100～1000rpm が好ましい。

消化された羊膜をガーゼなどのメッシュで越し、間葉系細胞を分離することができる。得られた間葉系細胞を遠心で集め、10%の血清を含む培養液中で、CO₂ インキュベータ中で培養する。培養温度は 37°C、CO₂ 濃度は 5% が好ましい。血清は子牛血清又は子牛胎児血清が好ましい。また、培養液には、濃度 1% 前後の抗生物質（前記と同様）を共存させることが好ましい。細胞密度は、 $10^5 \sim 10^6$ 細胞/ml が好ましい。間葉系細胞は、通常羊膜一枚から 5×10^6 個細胞が分離できる。

本発明の医薬組成物は、上述の方法で得られた、ヒト羊膜由来の上皮細胞又は間葉系細胞を含むことを特徴とする。

上皮細胞又は間葉系細胞を患者に投与する場合、共存する抗生物質や異種血清を完全に除去するために、生理食塩水で細胞を丹念に洗浄する。細胞を投与する場合には、細胞を生理食塩水又は培養液にサスペンションしたものを用いる。細胞濃度は、 $10^6 \sim 10^8$ 細胞/ml が好ましい。細胞を補助するために、増殖因子や細胞安定剤を混在させてもよい。

投与部位は、特に限定はないが、疾患に応じて、脾臓、脾臓、リウマチ疾患部位等の局所や種々の血管内が選択される。

投与する総細胞数は、患者の病態、体重等に依存する。

本発明の医薬組成物又は治療法により治療可能な疾患は、以下の通りである。

高脂血症、高血糖症、耐糖能不全 (impaired glucose tolerance: IGT) 状態、糖尿病合併症 (例えば網膜症、腎症、白内障、冠動脈疾患等)、動脈硬化症、心血管性疾患 (例えば虚血性心疾患等)。

一次骨粗鬆症、内分泌骨粗鬆症（甲状腺機能亢進症、副甲状腺機能亢進症、クッシング症候群、及び末端肥大症）、遺伝性及び先天性形態の骨粗鬆症（骨形成不完全、ホモシスチン尿症、メンケス症候群、及びライリーデイ症候群）及び四肢の固定による骨粗鬆症のような骨粗鬆症。

青年及び少年少女における骨のパジェット病（変形性骨炎）。

固形腫瘍（乳房、肺及び腎臓）に由来する高カルシウム血症及び血液学的悪性疾患（多発性骨髄腫、リンパ種及び白血病）、特発性高カルシウム血症、及び甲状腺機能亢進症及び腎機能不全に関連する高カルシウム血症。

外科手術後の、ステロイド投与に誘発された、及び小腸及び大腸の障害に関連した、及び慢性肝炎及び腎臓病に関連した骨減少症。

外傷性負傷に関連した、またはゴジエ病、鎌形赤血球性貧血、全身性紅斑性狼瘡及び他の疾患に関連した非外傷性壊死に関連した、骨壊死、または細胞死滅。

慢性間接リウマチによる骨減少。

歯周骨喪失。

骨溶解性転移。

変形性関節症、慢性間接リウマチ又は変形性脊椎症及びこれらに由来する間接の疼痛や頸肩腕痛、腰痛及び麻痺。

虚血性心疾患（例えば、狭心症、心筋梗塞、川崎病等）、弁膜症（例えば、僧

帽弁狭窄症、僧帽弁閉鎖不全症、僧帽弁逸脱症候群、大動脈弁狭窄症、大動脈弁閉鎖不全症等)、不整脈(例えば、心房細動、心房粗動、発作性上室性頻拍、W P W 症候群、房室結節回帰性頻拍、心室性期外収縮、心室頻拍、心室細動、徐脈性不整脈、洞不全症候群等)、大動脈・血管疾患(例えば、上行部大動脈瘤、弓部大動脈瘤、胸部大動脈瘤、胸部下行大動脈瘤、胸腹部大動脈瘤、腹部大動脈瘤、閉塞性動脈硬化症、静脈血栓、肺血栓閉塞症等)、先天性心疾患(例えば、心房中隔欠損症、心室中隔欠損症、Eisenmenger 症候群、肺動脈還流異常、動脈管開存症、心内膜床欠損症、完全大血管転移症、修正大血管転移症、肺動脈狭窄症、Fallot 四徴症、大動脈縮窄症、Valsalva 洞動脈瘤、Ebstein 奇形等)、心筋症(拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症等)。

[図面の簡単な説明]

図 1 は、羊膜由来上皮細胞及び間葉系細胞図を表す。

図 2 は、羊膜由来上皮細胞及び間葉系細胞投与マウスにおける血糖値変動図を表す。図中 M は間葉系細胞投与マウス、HAE は上皮系細胞投与マウスの血糖値の変動を表す。

図 3 は、上皮細胞移植脾臓におけるヒト $\beta 2$ -ミクログロブリン及びヒトインシュリンの発現を表す免疫組織染色図を表す。

図 4 は、培養羊膜由来間葉系細胞におけるヒトコラーゲンタイプ II 遺伝子の発現図。左図は位相差顕微鏡写真であり、形態変化を起こした細胞が観察された。右図は抗ヒトコラーゲンタイプ II 抗体による免疫染色図であり、形態変化を起こした細胞にヒトコラーゲンタイプ II の発現が観察された。

図 5 は、分離した間葉系細胞を 100ng/ml の FGF または 5 μ M の 5-アザシチジン存在下で約 1 ヶ月間培養し、心筋特異的な NKX2.5 に対する抗体で蛍光免疫染色法により染色した図を表す。

図 6 は、分離した間葉系細胞を 100ng/ml の FGF または 5 μ M の 5-アザシチジン存在下で約 1 ヶ月間培養した後に RNA を抽出し、ヒト NKX2.5 遺伝子が発現しているか否かを RT-PCR 法で確認した図。

[発明を実施するための最良の形態]

以下実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

実施例 1. ヒト上皮細胞及び間葉細胞の分離

インフォームドコンセントを得たヒト妊婦を帝王切開し、羊膜を入手した。得られた羊膜を滅菌した手術用ハサミで断片化し、0.2%トリプシンを含む細胞培養液（ダルベッコ修正イーグル培地：以下、「DMEM」という。）と共に 50ml のファルコンチューブに入れ、37°C のシェーカーで 100rpm で 30 分間振盪した。遠心後上清を除去し、再度滅菌した手術用ハサミで断片化し、37°C のシェーカーで 400-600rpm で 30 分間振盪し、0.2%トリプシンで消化した。溶液を滅菌ガーゼで越し、上皮細胞を分離した。上皮細胞は遠心によって集め、培養液 10%子牛胎児血清及び抗生物質（ペニシリン G、100 単位/ml：ストレプトマイシン、100 μ g/ml：アンフォテリシン B、0.25 μ g/ml）を含む DMEM で 37°C、5% CO₂ 下で培養した。ガーゼに残された羊膜は、再度滅菌した手術用ハサミで断片化し、同様に 0.2%トリプシンで 30 分間消化した。トリプシン消化と細胞回収の操作を 3 回繰り返す、上皮細胞を遠心で集め、3 \times 10⁵細胞/ml の細胞密度で、10%子牛胎児血清及び上記と同様の抗生物質を含む DMEM で 37°C、5% CO₂ 下で培養した。上皮細胞は、通常羊膜一枚から 5 \times 10⁷ 個細胞が分離できる。

羊膜間葉系の細胞は、上皮細胞が完全に取り除かれた羊膜より、分離した。ガーゼ上に残された羊膜をコラゲナーゼ（0.75mg/ml、和光純薬（株）製）、DNA アーゼ（0.075mg/ml、シグマ社製）で、37°C 60 分間 600rpm で振盪し、消化した。消化された羊膜をガーゼで越し、間葉系細胞を分離した。得られた間葉系細胞を遠心で集め、4 \times 10⁵細胞/ml の密度で 10%子牛胎児血清を含む DMEM で 37°C、5% CO₂ 下で抗生物質（ペニシリン G、100 単位/ml：ストレプトマイシン、100 μ g/ml：アンフォテリシン B、0.25 μ g/ml）存在下で培養した。間葉系細胞は、通常羊膜一枚から 5 \times 10⁶ 個細胞が分離できた。

分離した羊膜由来上皮細胞と間葉系細胞の写真を図 1 に示す。

試験例 1. ヒト羊膜由来上皮細胞による糖尿病治療効果

(1) 糖尿病マウスの作成

8-12 週の免疫不全の SCID(sever combined immunodeficient)マウスをヒト羊膜由来上皮細胞（以下、単に「上皮細胞」という。）又はヒト羊膜由来間葉系細胞（以下、単に「間葉系細胞」という。）の移植動物として使用した。SCID マウスに 250mg/kg のストレプトゾトシン (streptozotocin: 以下「STZ」という。) を濃度で腹腔内投与する事によって糖尿病を誘発し、該マウスの体重の低下や血糖値の上昇 (>300mg/dl) を確認した。STZ 投与から 1 週間後、麻酔下で、マウス脾臓に 1×10^6 細胞/0.1ml の上皮細胞または間葉系細胞を移植した。移植マウスの血糖値は、尻尾から採血した血清について、一日おきにアベンティスファーマ株式会社のダイアセンサーを使用し同社の実験プロトコールに従って午前 9-11 時の間に測定した。移植後 2～3 週間経過後、血糖値が正常範囲 (<100mg/dl) に回復した後、マウスを開腹し、脾臓および膵臓を切除し、以後の解析に供した。

(2) 免疫染色

(1) で得られたマウス脾臓及び膵臓につき、10%ホルマリン固定パラフィン切片を、4 乃至 6 ミクロンに薄切し、スライドガラスに貼付して作成し、使用した。

免疫染色又は蛍光免疫のための一次抗体として、以下のマウス由来モノクローナル抗体を使用した。抗ヒトインスリン抗体(オンコジーン社製: Ab-1/1:400 希釈)、抗ヒト β 2-ミクログロブリン抗体 (ファルミノーゲン社製: Col-2/1:800 希釈)、及び、抗ヒトコラーゲンタイプ II 抗体 (シグマ社製: Tu-99/1:1000 希釈)。二次抗体としてはウサギ抗マウス抗体を使用し、抗原検出システムとしてストレプトアビジン-ビオチン法 (SAB-PO キット: ニチレイ (株) 製) を使用した。但し、ヒトコラーゲンタイプ II の検出に限り二次抗体として FITC 標識

ウサギ抗マウス抗体を使用した。0.01M・pH6.0 クエン酸緩衝中で電子レンジで 15 分間加熱処理を行い、脱パラフィン後、内因性パーオキシダーゼ阻止操作（0.3% 過酸化水素添加メタノール中に 30 分静置）を行った。一次抗体結合反応は室温で 1 時間行い、ビオチン標識二次抗体結合反応は室温で 30 分行い、パーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(酵素試薬)は室温で 30 分結合させ、その後 DAB（ジアミノベンチジン）発色させた。

（３）PCR による検討

（２）で得られたマウス脾臓及び膵臓にヒトの細胞が存在することを検討するために、これら組織より DNA を抽出し、ヒト特異的な $\beta 2$ -ミクログロブリン遺伝子が存在するか否かを PCR 法で確認した。以下に詳細を記載する。

モレキュラーリサーチセンター社の DNAzol を使って、同社の実験方法に従って（２）で得られたマウス脾臓及び膵臓より DNA を抽出した。得られた DNA1 μ g を基質として、ヒト $\beta 2$ -ミクログロブリン遺伝子中のヒト特異ヌクレオチド配列に基づき設計したプライマー：

5'-gtgtctgggt ttcataatc-3' （配列番号 1）；

および

5'-ggcaggcata ctcattttt-3' （配列番号 2）

を用いて、アマーシャム社の Ready-To-Go PCR Beads を同社の実験プロトコールに従い使用して、94°C 1 分、56°C 1 分、72°C 2 分、30 サイクルで PCR を行った。PCR 後得られた DNA 鎖につき、2 %アガロースゲルを用い 100V で一時間電気泳動を行い、紫外線下で、ヒト $\beta 2$ -ミクログロブリン遺伝子に相当する 163bp のバンドを同定した。

（４）結果

8-12 週の免疫不全の SCID マウスに STZ 投与後 2 日目、血糖値は 300mg/dl を超え糖尿病が誘導できた。STZ 投与後一週間目に、上皮細胞または間葉細胞を脾臓に移植した。血糖値は、間葉細胞投与マウスでは 3 例中 3 例で高値のままで低下せず、一方、上皮細胞投与マウスでは 4 例中 1 例で高値のままで低下

しなかったものの、3例で正常範囲 (<100mg/dl) の値に回復した (図2)。更に血糖値が正常範囲に回復したマウスで、上皮細胞を移植した脾臓において、ヒトインスリンの発現が免疫組織学的に同定された (図3)。さらに同脾臓でヒト β 2-ミクログロブリンが発現することが免疫組織学的に確認された (図3)。さらに、PCRにより同脾臓中にヒト β 2-ミクログロブリン遺伝子の存在が確認できた。これらの結果より、ヒト羊膜上皮細胞より、 β 細胞が誘導されたことが確認された。

試験例2. ヒト羊膜由来間葉系細胞の軟骨細胞への分化

分離した間葉系細胞を *in vitro* で 100ng/ml の Bone Morphogenic Protein (BMP) 存在下で、約1ヶ月間高分子乳酸—ポリエチレングリコール (分子量約9500) と10%子牛胎児血清を含む DMEM で 37°C、5% CO₂ で抗生物質 (ペニシリン G、100 単位/ml : ストレプトマイシン、100 μ g/ml : アンフォテリシン B、0.25 μ g/ml) 存在下で共培養後、軟骨細胞特異的なコラーゲンタイプ II の抗体で下記のように蛍光免疫染色法により解析した。上記の培養間葉系細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、100%メタノールで -20°C で 10 分間、100%アセトンで -20°C 1 分間処理で細胞を固定した。次に抗ヒトコラーゲンタイプ II 抗体 (シグマ社製 : Tu-99/1 : 1000 希釈) を用い室温で 1 時間反応させ PBS で洗浄後、二次抗体として FITC 標識ウサギ抗マウス抗体で室温で 30 分間反応させた後 PBS で洗浄した後、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、形態が変化した細胞にのみ特異的にヒトコラーゲンタイプ II 遺伝子の発現が見られた (図4)。この結果より、ヒト羊膜間葉系細胞より、軟骨細胞が誘導できることが示された。

試験例3. ヒト羊膜由来間葉系細胞の心筋細胞への分化

(1) 分離した間葉系細胞を *in vitro* で 100ng/ml の FGF または 5 μ M の 5-アザシチジン (5-AZA) 存在下で、約1ヶ月間、10%子牛胎児血清を含む 37°C、5% CO₂ 下で抗生物質 (ペニシリン G、100 単位/ml : ストレプトマイシン、100 μ g/ml : アンフォテリシン B、0.25 μ g/ml) 存在下で培養後、心筋細胞特異的な転

写因子である NKX2.5(Komuro, I.; Izumo, S.: *Csx: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. Proc. Nat. Acad. Sci.* 90: 8145-8149, 1993.)に対する抗体を用いた蛍光免疫染色法により解析した。上記の培養間葉系細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、100%メタノールで-20°C、10 分間、100%アセトンで-20°C、1 分間処理して細胞を固定した。次に抗ヒト NKX2.5 抗体 (SANTA CRUZ 社製: sc-14033 を 1:200 希釈したもの) を用い室温で 1 時間反応させ、PBS で洗浄した後、二次抗体として FITC 標識ヤギ抗ウサギ抗体で室温で 30 分間反応させた後、PBS で洗浄し、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、FGF で処理した羊膜間葉系細胞のみで、NKX2.5 蛋白質の発現が認められた (図 5)。この結果により、ヒト羊膜間葉系細胞から、心筋細胞が誘導できることが示された。

(2) RT-PCR による検討

(1) で得られた細胞で心筋細胞特異的な転写因子 NKX2.5 遺伝子の転写が亢進しているか否かを検討するために、上記細胞から total RNA を抽出し、NKX2.5 遺伝子の発現を RT-PCR 法で確認した。RNAzol (モレキュラーリサーチセンター社製) を添付のプロトコールに従って用いて、(1) で得られた羊膜細胞より total RNA を抽出した。Total RNA、1 μ g を基質とし、ヒト NKX2.5 遺伝子中のヒト特異的なヌクレオチド配列に基づき設計したプライマー:

5'- cttcaagcca gaggcctacg -3' (配列表の配列番号 3);

および

5'- ccgcctctgt cttcttcagc -3' (配列表の配列番号 4);

を用いて、RT-PCR を行った。反応は RT-PCR キット (TAKARA 社製) を添付のプロトコールに従って用い、逆転写酵素で 42°C、30 分間反応させて cDNA を作製し、94°C で 30 秒、55°C で 30 秒、72°C で 30 秒の温度サイクルを 40 回繰り返して PCR 反応を行った。得られた産物を 2%アガロースゲルを用いて 100 ボルトで 1 時間、電気泳動を行い、紫外線下でヒト NKX2.5 の mRNA からの増幅産物に相当する 233bp のバンドを同定した。その結果、FGF 存在下で培養した細胞のみでヒト NKX2.5 特異的な増幅産物が確認された (図 6)。

〔産業上の利用の可能性〕

本発明を利用することにより、倫理的問題の生じないように、再生医療技術を用い、糖尿病治療薬等を提供することが可能になり、または、糖尿病患者等を治療することが可能になる。

請求の範囲

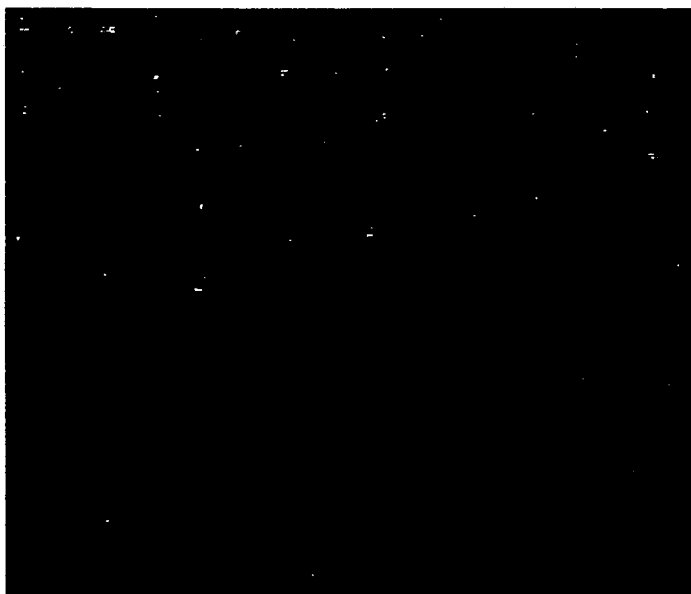
1. ヒト羊膜由来上皮細胞を有効成分とする医薬組成物。
2. ヒト羊膜由来上皮細胞を有効成分とする糖尿病治療剤。
3. ヒト羊膜由来上皮細胞を糖尿病患者に投与することを特徴とする糖尿病治療法。
4. ヒト羊膜由来間葉系細胞を有効成分とする医薬組成物。
5. ヒト羊膜由来間葉系細胞を有効成分とする骨代謝異常症治療剤。
6. ヒト羊膜由来間葉系細胞を骨代謝異常症患者に投与することを特徴とする骨代謝異常症治療法。
7. ヒト羊膜由来間葉系細胞を有効成分とする心疾患治療剤。
8. ヒト羊膜由来間葉系細胞を心疾患患者に投与することを特徴とする心疾患治療法。

1/6

[図1]



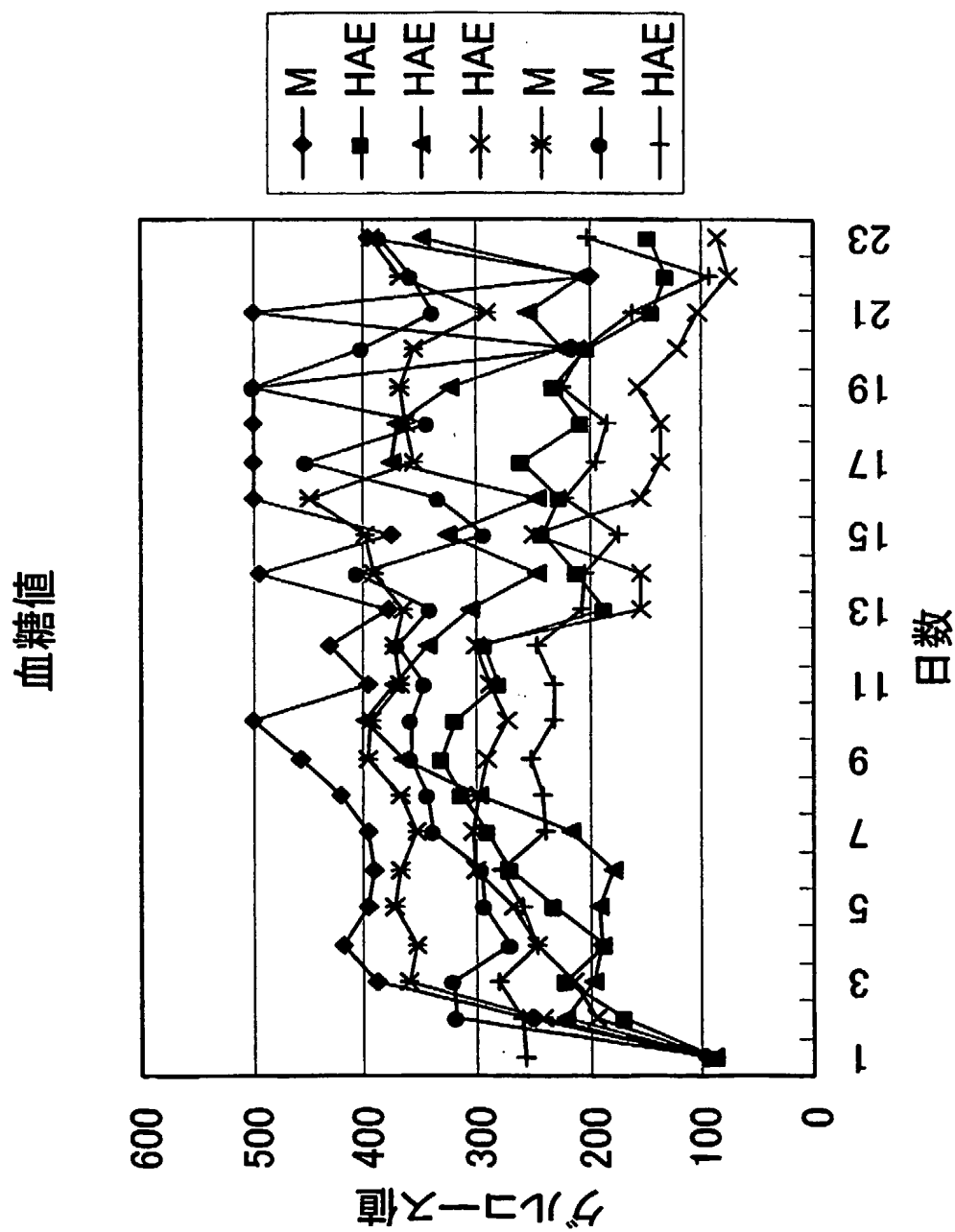
間葉系細胞



上皮細胞

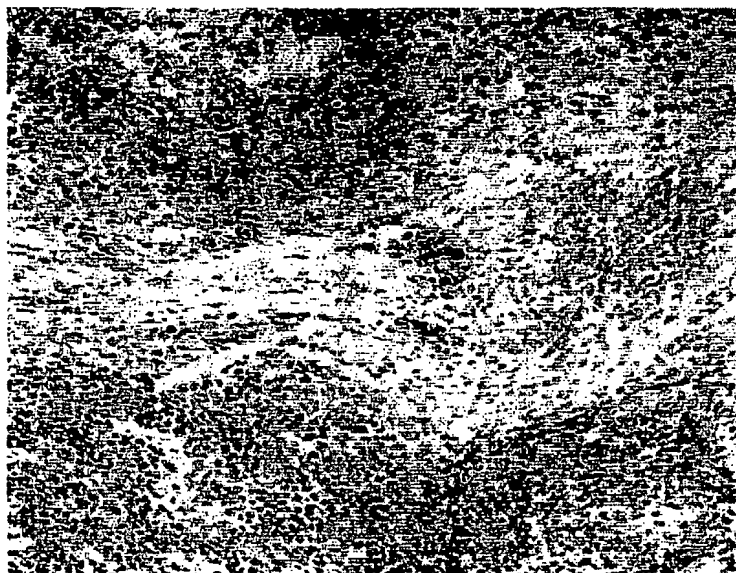
2/6

[図2]



3/6

[図3]



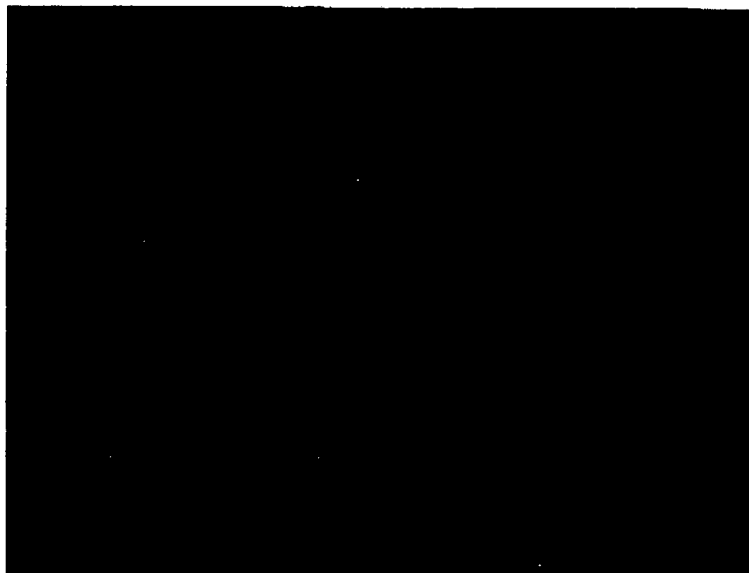
ヒトインシュリン



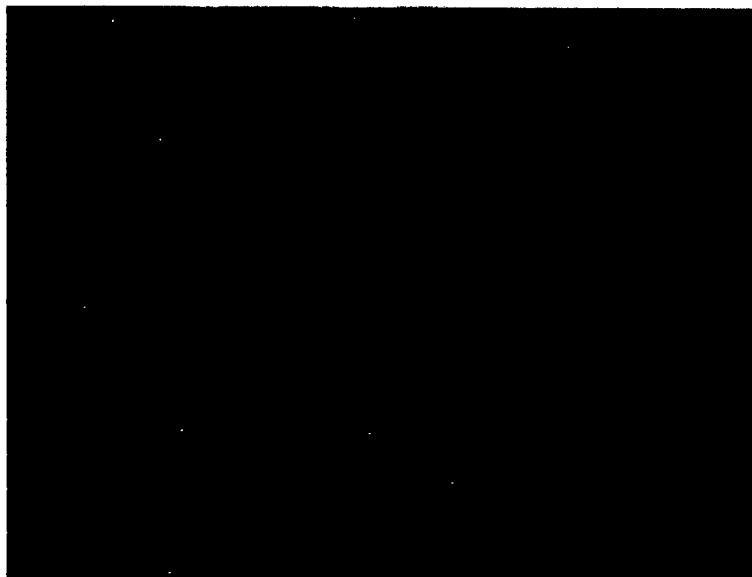
ヒト β 2ミクログロビン

4/6

[図4]



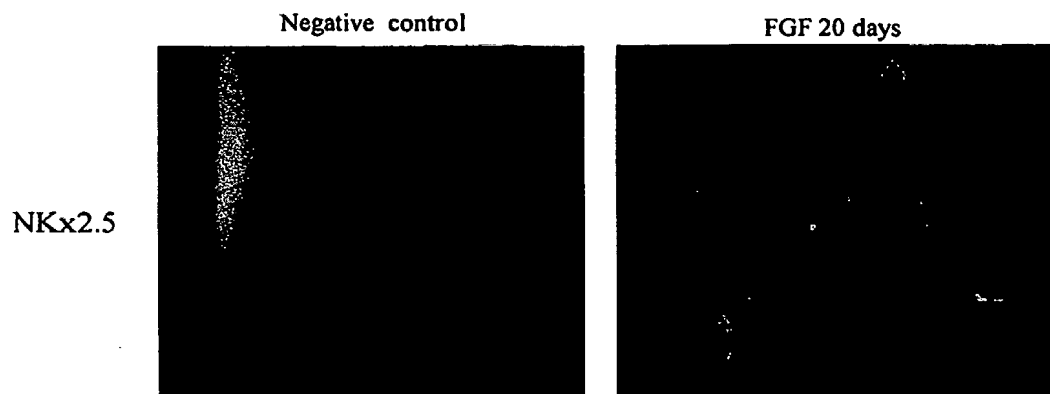
蛍光免疫染色
(コラーゲンタイプII抗体)



位相差顕微鏡

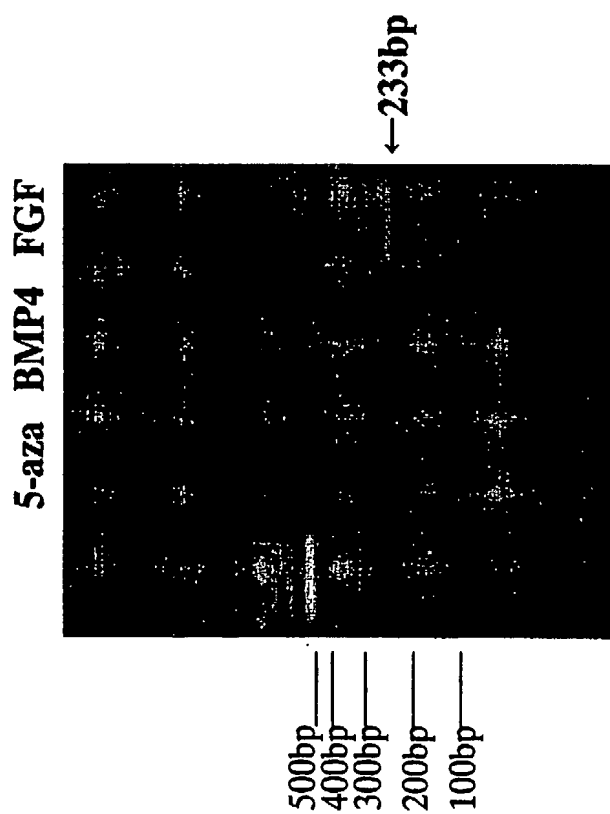
5/6

[図5]



6/6

[図6]



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Sankyo Company Limited

<110> Nikaido, Toshio

<120> A pharmaceutical composition comprising cells derived
from human caul

<130> 2001185K

<130> 2002099SM

<140>

<141>

<150>JP2001/372878

<151>2001-12-6

<150>JP2002/262265

<151>2002-9-9

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

2/3

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<223> Inventor: Nikaidoh, Toshio

<400> 1

gtgtctgggt ttcaatc

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ggcaggcata ctcatctttt

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

cttcaagcca gaggcctacg

20

<210> 4

<211> 20

3/3

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

ccgccicgt ctcctcagc

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12761

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K35/50, A61P3/10, A61P19/00, A61P19/08, A61P9/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K35/50, A61P3/10, A61P19/00, A61P19/08, A61P9/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X P,A	Kazutomo INOUE, "Kansaibo to Saisei Iryo - Rinsho Oyo no Tenbo -", Saibo, Nov. 2002, Vol.34, No.11, pages 432 to 433, full text; particularly, page 433, table 1	1, 2, 4, 5 7
P,X P,A	Sawanobu ENO et al., "Yomaku Johi Saibo no Kansaibo -yo Bunka to Saisei Iryo eno Oyo Kanosei ni tsuite", Organ Biology, Aug.2002, Vol.9, No.3, pages 265 to 274, full text	1 2, 4, 5, 7
P,X P,A	ANDREA-ROMANA, P. et al., "Amniotic fluid cells and human cell research: a new connection.", Medical Science Monitor, Nov.2002, Vol.8, No.11, pages RA253 to 257	1, 2 4, 5, 7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
20 January, 2003 (20.01.03)

Date of mailing of the international search report
12 February, 2003 (12.02.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA 210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12761

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X P,A	JP 2002-326943 A (Kabushiki Kaisha Japan Tissue Engineering), 15 November, 2002 (15.11.02), (Family: none)	1 2,4,5,7
X Y A	WO 00/73421 A1 (LIFEBANK SERVICES LLC), 07 December, 2000 (07.12.00), Full text; particularly, Claims; page 1, line 23 to page 2, line 20; page 9, line 6 to page 10, line 9 (Family: none)	1 2 4,5,7
X A	ADINOLFI, M. et al., "Expression of HLA antigens, β2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells.", Nature, 1992, Vol.295, No.5847, pages 325 to 327, abstract; page 326, right column, 3rd line from the bottom to page 327, right column, line 15	1 2,4,5,7
X A	WO 89/07425 A1 (GENETHICS LTD.), 24 August, 1989 (24.08.89), Full text & EP 333328 A1 & US 5612028 A	1 2,4,5,7
X A	DE 2715887 A1 (AYGUN S.T.), 12 October, 1978 (12.10.78), Full text (Family: none)	1 2,4,5,7
X A	WO 97/26902 A1 (SRL INC.), 31 July, 1997 (31.07.97), Full text & EP 815867 A1	1 2,4,5,7
Y	Natsuki NAGATA et al., "Saisei Iryo toshite no Saibo Ryoho no Genjo to Kadai -Suito Saisei Iryo eno Approach", Biotherapy, Mar.2001, Vol.15, No.2, pages 105 to 110, page 108, left column, last line to page 109, right column, last part	2
A	ANDERSON, H.C., The role of cells versus matrix in bone induction.", Connective Tissue Research, 1990, Vol.24, No.1, pages 3 to 12, full text; particularly, the passages relating to the FL cells.	1,2,4,5,7
A	BOYAN, B.D. et al., "Epithelial cell lines that induce bone formation in vivo produce alkaline phosphatase-enriched matrix vesicles in culture.", Clinical Orthopaedics and Related Research, 1992, No.277, pages 266 to 276, full text; particularly, the passages relating to the FL cells.	1,2,4,5,7

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12761

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 81/02674 A1 (TAGUCHI F.), 01 October, 1981 (01.10.81), Full text & JP 56-135420 A & GB 2083359 A & EP 48283 A1 & DE 3140623 A1	1, 2, 4, 5, 7
A	JP 57-171924 A (Fumiaki TAGUCHI), 22 October, 1982 (22.10.82), Full text (Family: none)	1, 2, 4, 5, 7
Y A	WO 00/29002 A2 (OSIRIS THERAPEUTICS INC.), 25 May, 2000 (25.05.00), Claims; particularly, Claims 1, 14, 15, 22; page 6, lines 27 to 32 & EP 1128836 A2 & JP 2002-529509 A	4, 5, 7 1, 2
Y A	WO 99/46366 A1 (OSIRIS THERAPEUTICS INC.), 16 September, 1999 (16.09.99), & JP 2002-506082 A	4, 5, 7 1, 2
Y A	LIECHTY, K.W. et al., "Distribution and engraftment of human mesenchymal stem cells (MSC) after in utero transplantation in fetal sheep.", Blood, 1998, Vol.92, No.10, suppl.1, page 117A	4, 5, 7 1, 2
Y A	CASEY, M.L. et al., "Interstitial collagen synthesis and processing in human amnion: a property of the mesenchymal cells.", Biol.Reprod., 1996, Vol.55, No.6, pages 1253 to 1260	4, 5, 7 1, 2
Y A	WHITTLE, W.L. et al., "The characterization of human amnion epithelial and mesenchymal cells: the cellular expression, activity and glucocorticoid regulation of prostaglandin output.", Placenta, 2000, Vol.21, No.4, pages 394 to 401	4, 5, 7 1, 2
A	ANDERSON, H.C., "Osteogenetic epithelial-mesenchymal cell interactions.", Clinical Orthopaedics and Related Research, 1976, No.119, pages 211 to 223	1, 2, 4, 5, 7
A	WLODARSKI, K., "Failure of heterotopic osteogenesis by epithelial mesenchymal cell interactions in xenogeneic transplants in the kidney.", Calcif. Tissue Res., 1978, Vol.25, No.1, pages 7 to 12	1, 2, 4, 5, 7
A	Nobuo SAKURAGAWA, "Tokushu Kansaibo Kenkyu no Shintenkai Chusu Shinkeikei Kansaibo", Seitai no Kagaku, 1998, Vol.49, No.3, pages 196 to 202, page 199, right column, page 201, right column to page 202; Figs. 3 to 7	1, 2, 4, 5, 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12761

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Norio KUMAGAYA, "Shorei Zenshin 95% o Jusho shita Nessho Kanji no Jika Baiyo Hyohi Ishoku ni yoru Kyumeirei", Biomedicine & Therapeutics, 2001 Oct., Vol.35, No.10, pages 1131 to 1134	1,2,4,5,7
A	Shigeto HARIMURA et al., "Ganka Ryoiki no Tissue Engineering", Gene & Medicine, 10 November, 2001 (10.11.01), Vol.5, No.4, pages 609 to 613, particularly, page 34	1,2,4,5,7
A	Kazuomi HANADA, "Shashin Seminar 205 Yomaku deno Kaiyo Heisa", The Journal of the Eye, 2001 Jun., Vol.18, No.6, pages 731 to 732	1,2,4,5,7
A	DAVIS, G.E. et al., "Human amnion membrane serves as a substratum for growing axons in vitro and in vivo", Science, 1987, Vol.236, No.4805, pages 1106 to 1109	1,2,4,5,7
A	MIGNATTI, P. et al., "In vitro angiogenesis on the human amniotic membrane: requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases.", J.Cell.Biol., 1989, Vol.108, No.2, pages 671 to 682	1,2,4,5,7
A	HUNT, J.S. et al., "Interferon- γ induces class I HLA and β 2-microglobulin expression by human amnion cells.", J.Immunol., 1986, Vol.136, No.2, pages 364 to 367	1,2,4,5,7
A	LEE, S.W. et al., "Immunohistological study of the localization of collagen types I-XI in bovine term placenta.", Animal Science Journal, 2000, Vol.71, No.5, pages 501 to 508	1,2,4,5,7
A	WO 84/04669 A (AMERICAN HOSPITAL SUPPLY CORP.), 06 December, 1984 (06.12.84), & EP 144398 A1 & JP 60-501395 A & US 4894063 A	1,2,4,5,7
A	JP 2001-161353 A (Yugen Kaisha Japan Ophthalmic Consultants), 19 June, 2001 (19.06.01), (Family: none)	1,2,4,5,7
A	EP 230672 A2 (AMERICAN HOSPITAL SUPPLY CORP.), 05 August, 1987 (05.08.87), Claim 4 (Family: none)	1,2,4,5,7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12761

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 3, 6, 8

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 3, 6 and 8 each pertains to methods for treatment of the human body by therapy.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

It cannot be said that the group of the inventions as set forth in claims 1 and 2 and the group of the inventions as set forth in claims 4, 5 and 7 have a single general inventive concept in common.
(continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12761

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

Medicinal compositions containing human amnion-origin epithelial cells are not novel because of being reported in, for example, the following documents cited in Box C of this international search report which have been clarified after discussing the prior art.

* WO 00/73421 A1 (LIFEBANK SERVICES LLC) 2000.12.07, the whole document, in particular, claims, p.1 line 23 to p.2 line 20, p.9 line 6 to p.10 line 9 (no family).

* WO 97/26902 A1 (SRL INC) 1997.07.31 the whole document & EP 815867 A1.

* WO 89/07425 A1 (GENETHICS LTD) 1989.08.24, the whole document & EP 333328 A1 & US 5612028A.

Therefore, provision of medicinal compositions containing human amnion-origin cells as the active ingredient, which specifies the inventions as set forth in claims 1, 2, 4, 5 and 7 in common, cannot be considered as a technical feature which had not been solved before the application of the present case.

Thus, it cannot be considered as having a single general inventive concept in common at least to groups of inventions which are specified by different items from the above-described one, i.e., medicinal compositions containing human amnion-origin cells as the active ingredient.

* Group of the inventions as set forth in claims 1 and 2 relating to medicinal compositions containing human amnion-origin epithelial cells as the active ingredient.

* Group of the inventions as set forth in claims 4, 5 and 7 relating to medicinal compositions containing human amnion-origin mesenchymal cells as the active ingredient.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ A61K35/50, A61P3/10, A61P19/00, A61P19/08, A61P9/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ A61K35/50, A61P3/10, A61P19/00, A61P19/08, A61P9/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN),
WPI (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X P, A	井上一知 '幹細胞と再生医療-臨床応用の展望-' 細胞, Nov. 2002, vol. 34, no. 11, p. 432-433 文献全体、特にp. 433表1	1, 2, 4, 5 7
P, X P, A	絵野沢伸他 '羊膜上皮細胞の幹細胞様文化と再生医療への応用可能性について' Organ Biology, Aug. 2002, vol. 9, no. 3, p. 265-274 文献全体	1 2, 4, 5, 7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20.01.03

国際調査報告の発送日

12.02.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大久保元浩

印

4C

8828

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	ANDREA-ROMANA, P. et al. 'Amniotic fluid cells and human cell research: a new connection.' Medical Science Monitor, Nov. 2002, vol. 8, no. 11, p. RA253-257	1, 2
P, A		4, 5, 7
P, X	JP 2002-326943 A(株式会社 ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング) 2002. 11. 15 (ファミリーなし)	1
P, A		2, 4, 5, 7
X	WO 00/73421 A1 (LIFEBANK SERVICES LLC) 2000. 12. 07 文献全体、特にclaims、p. 1第23行-p. 2第20行、p. 9第6行-p. 10第9行 (ファミリーなし)	1
Y		2
A		4, 5, 7
X	ADINOLFI, M. et al. 'Expression of HLA antigens, β 2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells.' Nature, 1992, vol. 295, no. 5847, p. 325-327 abstract, p. 326右欄下から第3行-p. 327右欄第15行	1
A		2, 4, 5, 7
X	WO 89/07425 A1 (GENETHICS LTD) 1989. 08. 24 文献全体 & EP 3 33328 A1 & US 5612028 A	1
A		2, 4, 5, 7
X	DE 2715887 A1 (AYGUN S T) 1978. 10. 12 文献全体 (ファミリーなし)	1
A		2, 4, 5, 7
X	WO 97/26902 A1 (SRL INC) 1997. 07. 31 文献全体 & EP 815867 A1	1
A		2, 4, 5, 7
Y	長田奈津紀他 '再生医療としての細胞療法の現状と課題-臍島再生医療へのアプローチ' Biotherapy, Mar. 2001, vol. 15, no. 2, p. 105-110 p. 108左欄最下行-p. 109右欄文献末尾	2
A	ANDERSON, H. C. 'The role of cells versus matrix in bone induction.' Connective Tissue Research, 1990, vol. 24, no. 1, p. 3-12 文献全体、特にFL細胞に係る記載箇所	1, 2, 4, 5, 7
A	BOYAN, B. D. et al. 'epithelial cell lines that induce bone formation in vivo produce alkaline phosphatase-enriched matrix vesicles in culture.' Clinical Orthopaedics and Related Research, 1992, no. 277, p. 266-276 文献全体、特にFL細胞に係る記載箇所	1, 2, 4, 5, 7

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 81/02674 A1 (TAGUCHI F) 1981.10.01 文献全体 & JP 56-13 5420 A & GB 2083359 A & EP 48283 A1 & DE 3140623 A1	1, 2, 4, 5, 7
A	JP 57-171924 A (田口文章) 1982.10.22 文献全体 (ファミリーなし)	1, 2, 4, 5, 7
Y	WO 00/29002 A2 (OSIRIS THERAPEUTICS INC) 2000.05.25 claims, 特にclaim1・14・15・22、第6頁第27-32行 & EP 1128836 A2 & JP 2002-529509 A	4, 5, 7
A		1, 2
Y	WO 99/46366 A1 (OSIRIS THERAPEUTICS INC) 1999.09.16 & JP 2002-506082 A	4, 5, 7
A		1, 2
Y	LIECHTY, K. W. et al. 'Distribution and engraftment of human m esenchymal stem cells (MSC) after in utero transplantation i n fatal sheep.' Blood, 1998, vol. 92, no. 10 suppl. 1, p. 117A	4, 5, 7
A		1, 2
Y	CASEY, M. L. et al. 'Interstitial collagen synthesis and proce ssing in human amnion: a property of the mesenchymal cells. ' Biol. Reprod., 1996, vol. 55, no. 6, p. 1253-1260	4, 5, 7
A		1, 2
Y	WHITTLE, W. L. et al. 'The characterization of human amnion ep ithelial and mesenchymal cells: the cellular expression, act ivity and glucocorticoid regulation of prostaglandin output. ' Placenta, 2000, vol. 21, no. 4, p. 394-401	4, 5, 7
A		1, 2
A	ANDERSON, H. C. 'Osteogenetic epithelial-mesenchymal cell inte ractions.' Clinical Orthopaedics and Related Research, 197 6, no. 119, p. 211-223	1, 2, 4, 5, 7
A	WLODARSKI, K. 'Failure of heterotopic osteogenesis by epithe lial mesenchymal cell interactions in xenogeneic transplants in the kidney.' Calcif. Tissue Res., 1978, vol. 25, no. 1, p. 7-12	1, 2, 4, 5, 7

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	桜川宣男 ‘特集 幹細胞研究の新展開 中枢神経系幹細胞’ 生体の科学, 1998, vol. 49, no. 3, p. 196-202 p. 199右欄、p. 201右欄-p. 202、図3-7	1, 2, 4, 5, 7
A	熊谷憲夫 ‘症例 全身95%を受傷した熱傷患児の自家培養表皮移植による救命例’ 治療学, 2001 Oct., vol. 35, no. 10, p. 1131-1134	1, 2, 4, 5, 7
A	榛村重人他 ‘眼科領域のTissue Engineering’ 遺伝子医学, 2001 No v.10, vol.5, no.4, p.609-613 特にp.34	1, 2, 4, 5, 7
A	花田一臣 ‘写真セミナー205. 羊膜での潰瘍閉鎖’ あたらしい眼科, 2001 Jun., vol.18, no.6, p.731-732	1, 2, 4, 5, 7
A	DAVIS,G.E. et al. ‘Human amnion membrane serves as a substratum for growing axons in vitro and in vivo.’ Science, 1987, vol.236, no. 4805, p.1106-1109	1, 2, 4, 5, 7
A	MIGNATTI,P. et al. ‘In vitro angiogenesis on the human amniotic membrane: requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteases.’ J.Cell.Biol., 1989, vol.108, no.2, p.671-682	1, 2, 4, 5, 7
A	HUNT,J.S. et al. ‘Interferon- γ induces class I HLA and β 2-microglobulin expression by human amnion cells.’ J.Immunol., 1986,vol.136, no.2, p.364-367	1, 2, 4, 5, 7
A	LEE,S.W. et al. ‘Immunohistological study of the localization of collagen types I~XI in bovine term placenta.’ Animal Science Journal, 2000,vol.71, no.5, p.501-508	1, 2, 4, 5, 7
A	WO 84/04669 A1 (AMERICAN HOSPITAL SUPPLY CORP) 1984.12.06 & EP 144398 A1 & JP 60-501395 A & US 4894063 A	1, 2, 4, 5, 7
A	JP 2001-161353 A (有限会社ジャパン・オブサルミック・コンサルタンツ) 2001.06.19 (ファミリーなし)	1, 2, 4, 5, 7
A	EP 230672 A2(AMERICAN HOSPITAL SUPPLY CORPORATION) 1987.08.05 claim 4 (ファミリーなし)	1, 2, 4, 5, 7

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 3, 6, 8 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲 3, 6, 8 は、いずれも治療による人体の処置方法に関するものである。

2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲 1, 2 の発明群と、請求の範囲 4, 5, 7 の発明群とは、互いに単一の一般的発明概念を共有しているとはいえない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(1)) (1998年7月)

(第II欄の続き)

ヒト羊膜由来の上皮細胞を有効成分とする医薬組成物は、先行技術を検討した後に明らかとなった本国際調査報告C欄掲載の文献中の例えば

- ・ WO 00/73421 A1 (LIFEBANK SERVICES LLC) 2000.12.07 文献全体、特にclaims、p.1 第23行-p.2第20行、p.9第6行-p.10第9行 (ファミリーなし)
- ・ WO 97/26902 A1 (SRL INC) 1997.07.31 文献全体 & EP 815867 A1
- ・ WO 89/07425 A1 (GENETHICS LTD) 1989.08.24 文献全体 & EP 333328 A1 & US 5612028 A

に記載されており新規ではないから、請求の範囲1, 2, 4, 5, 7の各発明群の間で共通する発明特定事項である、ヒト羊膜由来の細胞を有効成分とする医薬組成物を提供する、という点は、本願出願前未解決の技術的特徴であるということとはできない。

よって、少なくとも、ヒト羊膜由来の細胞を有効成分とする医薬組成物であるという上記の点以外の発明特定事項において異なる発明群、即ち、

- ・ ヒト羊膜由来上皮細胞を有効成分とする医薬組成物である請求の範囲1, 2の発明群と
- ・ ヒト羊膜由来間葉系細胞を有効成分とする医薬組成物である請求の範囲4, 5, 7の発明群

とは、互いに単一の一般的発明概念を共有しているとはいえない。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.